

## 日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 1月29日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第023246号

出 願 人

Applicant (s):

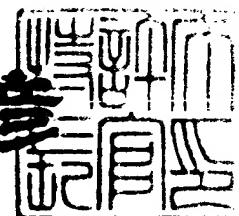
アマシャム ファルマシア バイオテック株式会社

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 3月 3日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3011598

【書類名】 特許願

【整理番号】 982365

【提出日】 平成11年 1月29日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C08F

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都品川区戸越 1 - 1 5 - 1 8

    【氏名】 秋山 義勝

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都台東区三ノ輪 1 - 1 8 - 9   2 0 3 号

    【氏名】 吉廻 公博

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県市川市中国分 5 - 9 - 1 1

    【氏名】 長谷川 幸雄

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県市川市国府台 6 - 1 2 - 1 2

    【氏名】 岡野 光夫

【特許出願人】

    【識別番号】 597145779

    【氏名又は名称】 アマシャム ファルマシア バイオテック株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100089705

    【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2  
0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 社本 一夫

【選任した代理人】

    【識別番号】 100071124

    【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠次

【選任した代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100096013

【弁理士】

【氏名又は名称】 富田 博行

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

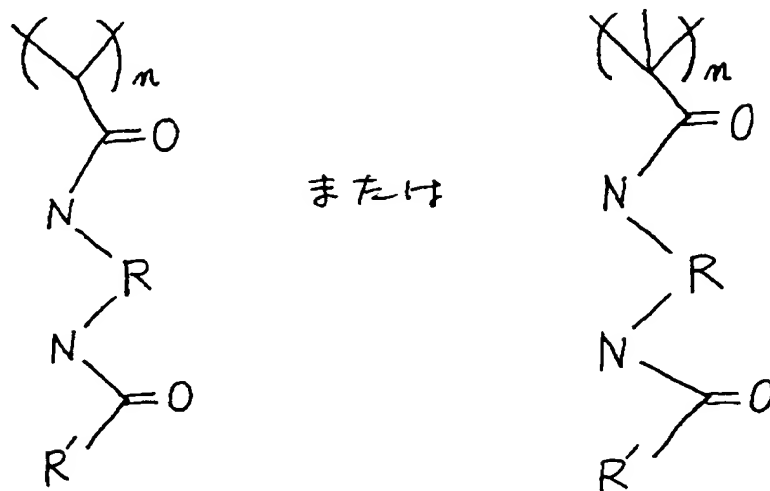
【書類名】 明細書

【発明の名称】 熱応答性高分子材料およびその製法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下式

【化 1】



(式中、Rは炭素数1～8の直鎖または分岐の2価の脂肪族炭化水素基、炭素数3～8の2価の脂環式炭化水素基または炭素数6～14の2価の芳香族炭化水素基を示し、R'は炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の水酸基を有する炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有する炭素数2～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、または1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有し、かつ1個または2個以上の水酸基を含む炭素数3～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基を示し、nは2以上の整数を表す)で表される高分子化合物。

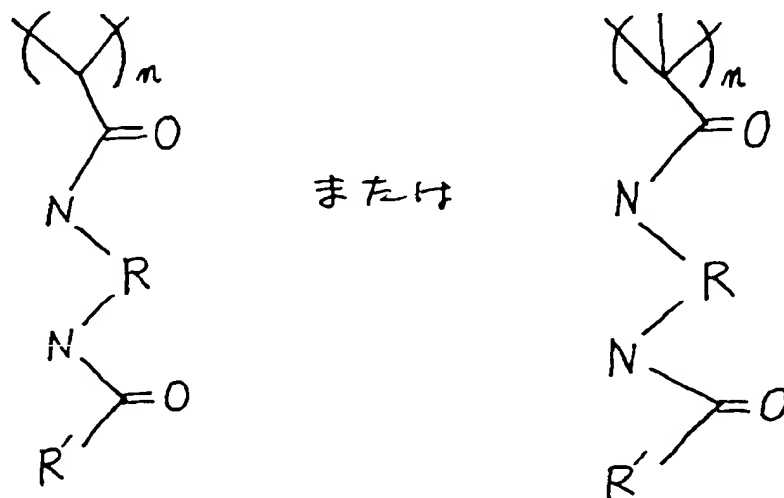
【請求項 2】 高分子末端に官能基を有する請求項 1 記載の高分子化合物。

【請求項 3】 官能基がカルボキシル基、アミノ基およびヒドロキシ基からなる群より選択される請求項 2 記載の高分子化合物。

【請求項 4】 酸アミド結合を高分子側鎖に2カ所以上有する請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項記載の記載の高分子化合物。

【請求項5】 下式

【化2】



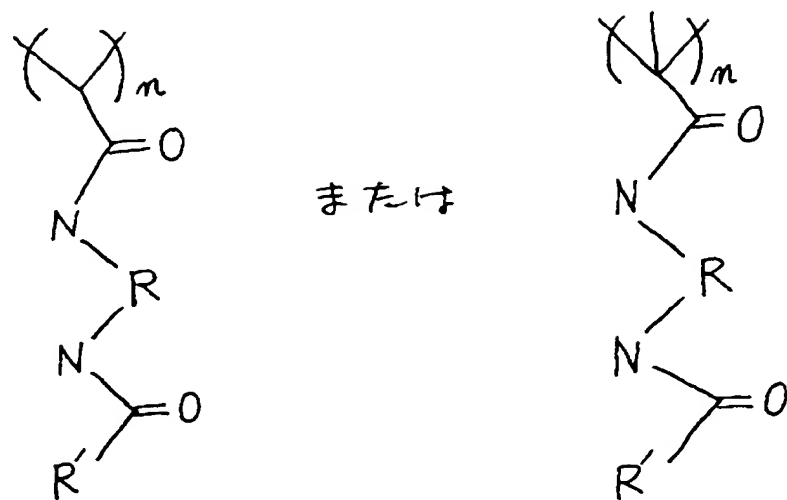
(式中、Rは炭素数1～8の直鎖または分岐の2価の脂肪族炭化水素基、炭素数3～8の2価の脂環式炭化水素基または炭素数6～14の2価の芳香族炭化水素基を示し、R'は炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の水酸基を有する炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有する炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、または1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有し、かつ1個または2個以上の水酸基を含む炭素数3～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基を示し、nは2以上の整数を表す)で表される高分子化合物を含み、水溶液中で温度変化により曇点を示す熱応答性高分子材料。

【請求項6】 高分子化合物が酸アミド結合を高分子側鎖に2カ所以上有する請求項5記載の熱応答性高分子材料。

【請求項7】 曇点を堺にして親水性、疎水性の極性が変化し、pH濃度、塩濃度もしくはRおよびR'の大きさに曇点および極性が制御できる請求項5または6記載の熱応答性高分子材料。

【請求項8】 下式

【化 3】



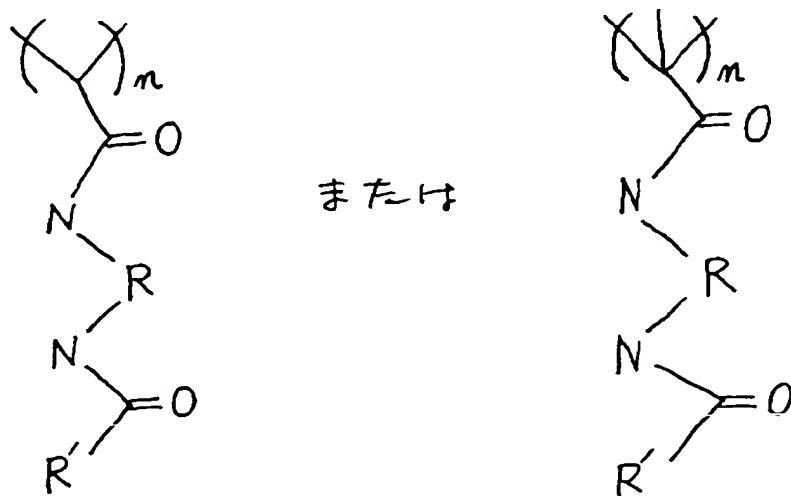
(式中、Rは炭素数1～8の直鎖または分岐の2価の脂肪族炭化水素基、炭素数3～8の2価の脂環式炭化水素基または炭素数6～14の2価の芳香族炭化水素基を示し、R'は炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の水酸基を有する炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有する炭素数2～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、または1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有し、かつ1個または2個以上の水酸基を含む炭素数3～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基を示し、nは2以上の整数を表す)で表される高分子化合物を含み、水溶液中で温度変化により曇点を示す熱応答性高分子材料を含むクロマトグラフィー用充填剤。

【請求項9】 高分子化合物が酸アミド結合を高分子側鎖に2カ所以上有する請求項8記載のクロマトグラフィー用充填剤。

【請求項10】 請求項7記載のクロマトグラフィー用充填剤よりなる固定相に物質を保持させた後、外部温度を段階的に変化させる温度グラディエント法により固定相表面の親水性／疎水性のバランスを変化させ、同一の移動相を通過させることによって物質を分離することを特徴とする物質の分離方法。

【請求項11】 下式

【化4】



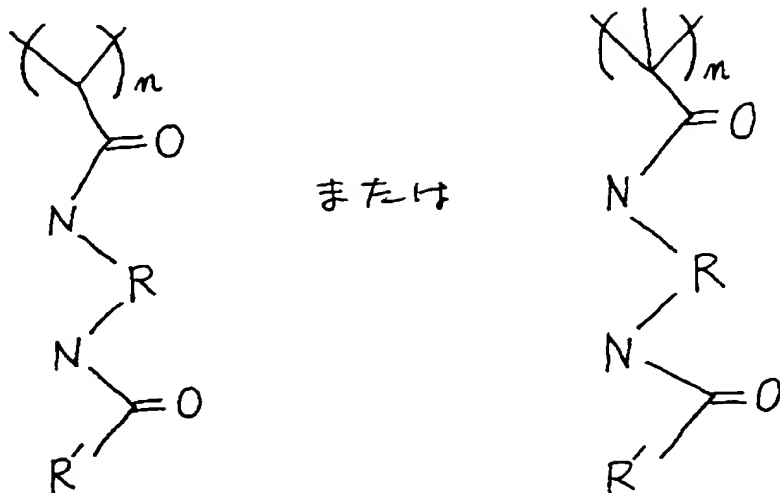
(式中、Rは炭素数1～8の直鎖または分岐の2価の脂肪族炭化水素基、炭素数3～8の2価の脂環式炭化水素基または炭素数6～14の2価の芳香族炭化水素基を示し、R'は炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の水酸基を有する炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有する炭素数2～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、または1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有し、炭素数1個または2個以上の水酸基を含む炭素数3～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基を示し、nは2以上の整数を表す)で表される高分子化合物の製造方法であって、

(1) アミノアルキルアクリルアミド、アミノアルキルメタクリルアミド、アミノアルキルアクリルアミド塩酸塩およびアミノアルキルメタクリルアミド塩酸塩のうちのいずれかの化合物と酸無水物もしくはラクトンと反応させて得られる生成物を精製し、溶媒中で重合反応に付する、または

(2) アルキルジアミンと酸無水物もしくはアルキル酸クロライドもしくは二炭酸ジ- $\alpha$ -ブチルとの反応により得られた生成物もしくは1つのアミノ基とアミド結合を分子内に有する化合物とアクリロイルクロライドもしくはメタクリロイルクロライドとの反応物を精製し、得られた精製物を溶媒中で重合反応に付する、のいずれかの方法を用いることを特徴とする前記製造方法。

【請求項 12】 下式

【化 5】



(式中、Rは炭素数1～8の直鎖または分岐の2価の脂肪族炭化水素基、炭素数3～8の2価の脂環式炭化水素基または炭素数6～14の2価の芳香族炭化水素基を示し、R'は炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の水酸基を有する炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有する炭素数2～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、または1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有し、かつ1個または2個以上の水酸基を含む炭素数3～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基を示し、nは2以上の整数を表す)で表される高分子化合物であって、酸アミド結合を高分子側鎖に2カ所以上有する高分子化合物を含む生体試料の分離、吸着材料。

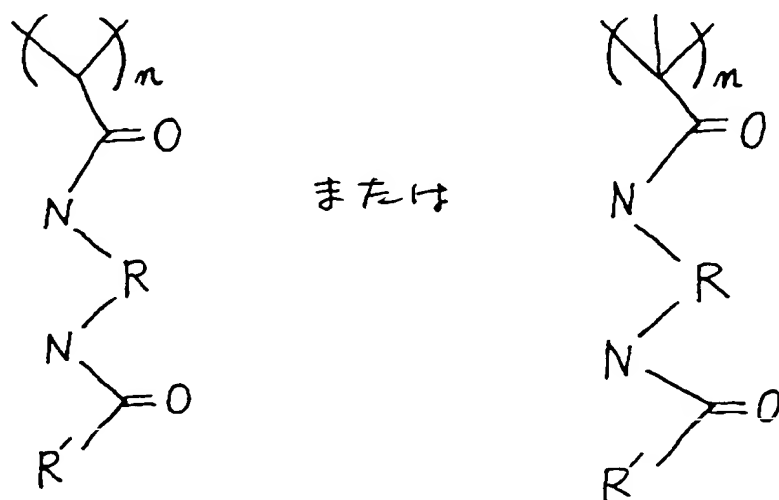
【請求項 13】 高分子末端に官能基を有する請求項 12 記載の生体試料の分離、吸着材料。

【請求項 14】 官能基がカルボキシル基、アミノ基およびヒドロキシ基からなる群より選択される請求項 13 記載の生体試料の分離、吸着材料。

【請求項 15】 下式



【化 6】



(式中、Rは炭素数1～8の直鎖または分岐の2価の脂肪族炭化水素基、炭素数3～8の2価の脂環式炭化水素基または炭素数6～14の2価の芳香族炭化水素基を示し、R'は炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の水酸基を有する炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有する炭素数2～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、または1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有し、かつ1個または2個以上の水酸基を含む炭素数2～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基を示し、nは1以上の整数を表す)で表される高分子化合物であって、酸アミド結合を高分子側鎖に2カ所以上有する高分子化合物を含む生体試料の分離、吸着材料よりなる、固定相に生体試料を保持させた後、外部温度を変化させることにより親水性、疎水性のバランスを変化させて、細胞などの生体試料を吸着、分離することを特徴とする物質の分離方法。

【請求項16】 高分子末端に官能基を有する請求項15記載の物質の分離方法。

【請求項17】 官能基がカルボキシル基、アミノ基およびヒドロキシ基からなる群より選択される請求項16記載の物質の分離方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、温度変化により高分子自身の極性変化と共に高分子が伸縮、凝集を起こす新規な高分子化合物およびその製造法、該化合物を含む熱応答性高分子材料、該熱応答性高分子材料を含む材料による分離方法、該材料を用いる化学物質、タンパク質やペプチドなどの生体高分子物質および細胞などの生体試料の分離方法に関するものである。

## 【0002】

## 【従来の技術】

酸アミド結合を有する熱応答性高分子材料として、代表的なものはN-イソプロピルアクリルアミドなどのアルキルアクリルアミド系列が挙げられる。側鎖が酸アミド結合系の高分子では、一般的には側鎖の炭素数が大きくなることで、曇天が徐々に低くなり、より大きな側鎖を導入すると高分子が水溶液に溶解しなくなる。そのため、酸アミド結合系の熱応答性高分子では側鎖に炭素数の大きな側鎖を有する熱応答性高分子が合成できなかった。また、アルキルアミド結合系の高分子では十分な極性をすべてのタンパク質分離に関して提供することが困難である。

## 【0003】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、炭素数の大きな側鎖を有する熱応答性高分子を合成するため、酸アミド結合を高分子化合物の側鎖に2カ所以上入れることで、炭素数の大きな側鎖を有する熱応答性材料とその製造法を提供することを目的とする。また、本発明は、かかる熱応答性高分子を様々な極性を有するタンパク質や化学物質もしくはバイオプロダクトや細胞などの生体材料の分離、精製へ応用することを目的とする。

## 【0004】

## 【課題を解決するための手段】

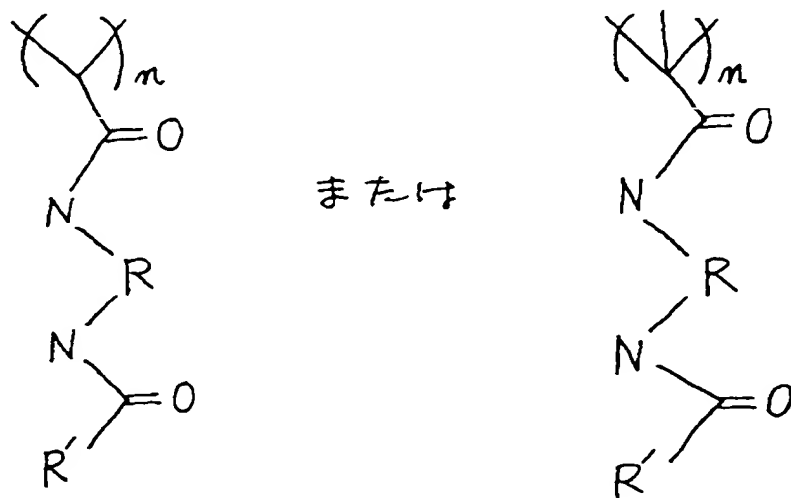
本発明者らは、側鎖に大きな炭素数を有する熱応答性高分子材料を合成するために、側鎖に2カ所以上の酸アミド結合もしくはエステル結合を導入して、大きな炭素数の側鎖を導入した材料を製造し、これが熱応答性を示すことを見いだし

た。また、本発明者らは、この材料が様々な極性を有するタンパク質等のバイオプロダクト分離へ応用することができることを見いだした。本発明はかかる知見に基づいて完成したものである。

【0005】

すなわち、本発明は、下式

【化7】



(式中、Rは炭素数1～8の直鎖または分岐の2価の脂肪族炭化水素基、炭素数6～8の2価の脂環式炭化水素基または炭素数6～14の2価の芳香族炭化水素基を示し、R'は炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の水酸基を有する炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有する炭素数2～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、または1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有し、かつ1個または2個以上の水酸基を含む炭素数3～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基を示し、nは2以上の整数を表す)で表される高分子化合物を提供する。

【0006】

また、本発明は、上記式で表される高分子化合物を含み、水溶液中で温度変化により曇点を示す熱応答性高分子材料を提供する。

さらに、本発明は、上記式で表される高分子化合物を含み、水溶液中で温度変

化により曇点を示す熱応答性高分子材料を含むクロマトグラフィー用充填剤を提供する。

加えて、本発明は、上記クロマトグラフィー用充填剤よりなる固定相に物質を保持させた後、外部温度を段階的に変化させる温度グラディエント法により固定相表面の親水性／疎水性のバランスを変化させ、同一の移動相を通過させることによって物質を分離することを特徴とする物質の分離方法を提供する。

さらに加えて、本発明は、上記式で表される高分子化合物の製造方法であって、(1) アミノアルキルアクリルアミド、アミノアルキルメタクリルアミド、アミノアルキルアクリルアミド塩酸塩およびアミノアルキルメタクリルアミド塩酸塩のうちのいずれかの化合物と酸無水物もしくはラクトンと反応させて得られる生成物を精製し、溶媒中で重合反応に付する、または

(2) アルキルジアミンと酸無水物もしくはアルキル酸クロライドとの反応により得られた生成物もしくは1つのアミノ基とアミド結合を分子内に有する化合物とアクリロイルクロライドもしくはメタクリロイルクロライドとの反応物を精製し、得られた精製物を溶媒中で重合反応に付する、のいずれかの方法を用いることを特徴とする当該高分子化合物の製造方法を提供する。

さらに、本発明は、上記式で表される高分子化合物であって、酸アミド結合を高分子側鎖に2カ所以上有する高分子化合物を含む生体試料の分離、吸着材料を提供する。

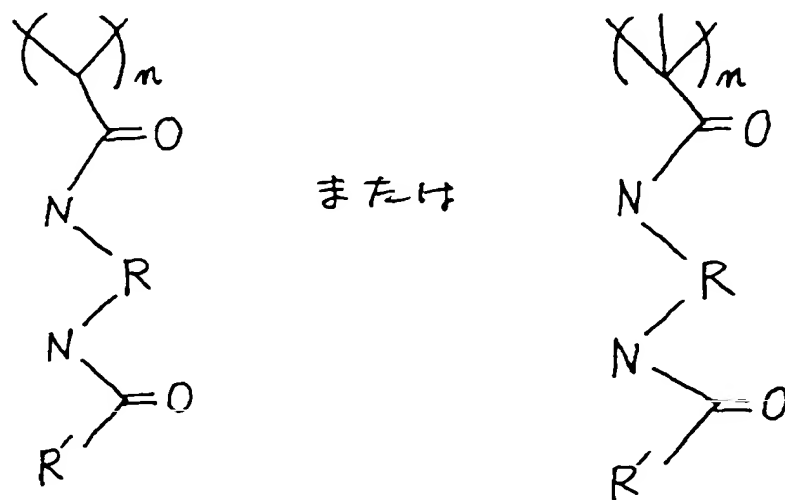
さらに加えて、本発明は、上記式で表される高分子化合物であって、酸アミド結合を高分子側鎖に2カ所以上有する高分子化合物を含む生体試料の分離、吸着材料よりなる、固定相に生体試料を保持させた後、外部温度を変化させることにより親水性、疎水性のバランスを変化させて、細胞などの生体試料を吸着、分離することを特徴とする物質の分離方法を提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明に係る高分子化合物は以下に示す構造を有する。

【化 8】



式中、Rは炭素数1～8の直鎖または分岐の2価の脂肪族炭化水素基、炭素数3～8の2価の脂環式炭化水素基または炭素数6～14の2価の芳香族炭化水素基を示し、R'は炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の水酸基を有する炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有する炭素数2～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、または1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有し、かつ1個または2個以上の水酸基を含む炭素数3～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基を示し、nは2以上の整数を表す。

【0008】

本発明において、炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基とは炭素数1～8の直鎖または分岐のアルキル基、炭素数2～8の直鎖または分岐のアルケニル基、炭素数2～8の直鎖または分岐のアルキニル基のいずれかを意味し、アルケニル基の二重結合の数およびアルキニル基の三重結合の数はそれぞれ1または2以上である。好ましいアルキル基の例としてはメチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、i-ブチル基、s-ブチル基およびt-ブチル基を、好ましいアルケニル基の例としてはビニル基、1-プロペニル基、2-プロペニル基（アリル基）、1-ブテニル基、2-ブテニル基および

3-ブテニル基を、好ましいアルキニル基の例としてはエチニル基、1-プロピニル基、2-プロピニル基（プロパルギル基）、1-ブチニル基および2-ブチニル基を挙げることができる。

#### 【0009】

本発明において、炭素数1～8の直鎖または分岐の2価の脂肪族炭化水素基とは炭素数1～8の直鎖または分岐の2価のアルキル基、炭素数2～8の直鎖または分岐の2価のアルケニル基、炭素数2～8の直鎖または分岐の2価のアルキニル基のいずれかを意味し、アルケニル基の二重結合の数およびアルキニル基の三重結合の数はそれぞれ1または2以上である。好ましい炭素数1～8の直鎖または分岐の2価のアルキル基の例としては、メチレン基、エチレン基、エチリデン基、トリメチレン基、プロピレン基（1, 2-プロパンジイル基）、イソプロピリデン基、テトラメチレン基、エチルエチレン基、ペンタメチレン基、ヘキサメチレン基、ヘプタメチレン基、オクタメチレン基を、好ましい炭素数2～8の直鎖または分岐の2価のアルケニル基の例としては、ビニレン基、ビニリデン基、プロペニレン基、1-ブテニレン基、2-ブテニレン基、1-ペンテニレン基、2-ペンテニレン基、1-ヘキセニレン基、2-ヘキセニレン基、3-ヘキセニレン基を、好ましい炭素数2～8の直鎖または分岐の2価のアルキニル基の例としては、エチニレン基、プロピニレン基、1-ブチニレン基、2-ブチニレン基を挙げることができる。

#### 【0010】

本発明において、炭素数3～8の脂環式炭化水素基とは、炭素数3～8のシクロアルキル基または炭素数3～8のシクロアルケニル基のいずれかを意味する。シクロアルケニル基の二重結合の数は1または2以上である。好ましいシクロアルキル基の例としてはシクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基およびシクロヘキシル基を、好ましいシクロアルケニル基の例としては1-シクロプロペン-1-イル基、2-シクロプロペン-1-イル基、1-シクロブテン-1-イル基、2-シクロブテン-1-イル基、1-シクロペンテン-1-イル基、2-シクロペンテン-1-イル基、3-シクロペンテン-1-イル基、1-シクロヘキセン-1-イル基、2-シクロヘキセン-1-イル基および3-シクロ

ヘキセン-1-イル基を挙げることができる。

【0011】

本発明において、炭素数3～8の2価の脂環式炭化水素基とは、炭素数3～8の2価のシクロアルキル基または炭素数3～8の2価のシクロアルケニル基のいずれかを意味する。好ましい炭素数3～8の2価のシクロアルキル基の例としては、1,2-シクロプロピレン基、1,2-シクロブチレン基、1,3-シクロブチレン基、1,2-シクロペンチレン基、1,3-シクロペンチレン基、1,2-シクロヘキシレン基、1,3-シクロヘキシレン基、1,4-シクロヘキシレン基、1,2-シクロオクチレン基、1,3-シクロオクチレン基、1,4-シクロオクチレン基、1,5-シクロオクチレン基を、好ましい炭素数3～8の2価のシクロアルケニル基の例としては、1-シクロプロペン-1,2-エニレン基、1-シクロブテン-1,2-エニレン基、1-シクロブテン-3,4-イレン基、1-シクロヘキセン-1,2-エニレン基、3-シクロヘキセン-1,2-イレン基、4-シクロヘキセン-1,2-イレン基、2,5-シクロヘキサジエン-1,4-イレン基を挙げることができる。

【0012】

本発明において、炭素数6～14の芳香族炭化水素基とは、炭素数6～14の芳香族基または芳香族基を意味する。好ましい芳香族炭化水素基例としては、フェニル基、ベンジル基、フェネチル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基、1-アントリル基、2-アントリル基、9-アントリル基、1-フェナントリル基、2-フェナントリル基、3-フェナントリル基、4-フェナントリル基、9-フェナントリル基等を挙げることができる。

【0013】

本発明において、炭素数6～14の2価の芳香族炭化水素基とは、炭素数6～14の2価のアリール基または2価のアラルキル基を意味する。好ましい炭素数6～14の2価の芳香族炭化水素基としては、o-フェニレン基、m-フェニレン基、p-フェニレン基、 $-o-\phi-CH_2-$ 、 $-m-\phi-CH_2-$ 、 $-p-\phi-CH_2-$ を挙げることができる。なお、上記において、 $\phi$ はベンゼン環を表す。

【0014】

本発明において、1個または2個以上の水酸基を有する炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基とは、上記炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基における任意の位置の1個または2個以上の炭素原子が水酸基を有する脂肪族炭化水素基を意味する。2個の水酸基を有する場合、1個の炭素原子に2個の水酸基が置換されていてもよい。好ましい基としては、ヒドロキシメチル基、2-ヒドロキシエチル基、1-ヒドロキシエチル基、1-ヒドロキシ-n-プロピル基、2-ヒドロキシ-n-プロピル基、3-ヒドロキシ-n-プロピル基、1-ヒドロキシ-1-メチルエチル基、2-ヒドロキシ-1-メチルエチル基、1-ヒドロキシ-n-ブチル基、2-ヒドロキシ-n-ブチル基、3-ヒドロキシ-n-ブチル基、4-ヒドロキシ-n-ブチル基、1-ヒドロキシ-1-メチル-n-プロピル基、2-ヒドロキシ-1-メチル-n-プロピル基、3-ヒドロキシ-1-メチル-n-プロピル基、1-ヒドロキシ-2-メチル-n-プロピル基、2-ヒドロキシ-2-メチル-n-プロピル基、3-ヒドロキシ-2-メチル-n-プロピル基、1-ヒドロキシメチル-1-メチルエチル基、2-ヒドロキシ-1, 1-ジメチルエチル基、1-ヒドロキシビニル基、2-ヒドロキシビニル基、1-ヒドロキシアリル基、2-ヒドロキシアリル基、3-ヒドロキシアリル基、2-ヒドロキシ-1-メチルビニル基、1-ヒドロキシメチルビニル基を挙げることができる。

#### 【0015】

本発明において、1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有する炭素数2～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基とは、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基のいずれかの基であって、その炭素原子が1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有する基によって置換された形の基であって、合計の炭素数が2～9の直鎖または分岐の基である。好ましい基としては、アセチルオキシメチル基、2-アセチルオキシエチル基、3-アセチルオキシ-n-プロピル基、1-アセチルオキシ-1, 1-ジメチル-メチル基、4-アセチルオキシ-n-ブチル基、2-アセチルオキシ-1, 1-ジメチル-エチル基、3-アセチルオキシ-1-メチル-n-プロピル基、2-アセチルオキシ-2, 2-ジメチル-エチル基、プロピオニルオキシメチ



ル基、2-プロピオニルオキシ-エチル基、3-プロピオニルオキシ-n-プロピル基、1-プロピオニルオキシ-1, 1-ジメチル-メチル基、アセトアミドメチル基、2-アセトアミド-エチル基、3-アセトアミド-n-プロピル基、1-アセトアミド-1, 1-ジメチル-メチル基、プロピオニルアミノメチル基、2-プロピオニルアミノ-エチル基、3-プロピオニルアミノ-n-プロピル基、1-プロピオニルアミノ-1, 1-ジメチル-メチル基を挙げることができる。

## 【0016】

本発明において、1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有し、かつ1個または2個以上の水酸基を含む炭素数3～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基とは、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基のいずれかの基であって、その炭素原子が1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有する基および1個または2個以上の水酸基によって置換された形の基であって、合計の炭素数が3～9の直鎖または分岐の基である。好ましい基の例として、(1-ヒドロキシプロピオン酸)メチル基、(1-ヒドロキシプロピオン酸)エチル基、(1-ヒドロキシプロピオンアミノ)メチル基、(1-ヒドロキシプロピオンアミノ)エチル基を挙げることができる。

## 【0017】

本発明において、上記式で表される高分子化合物のnは2以上であれば良く、分離する材料等の条件によりnの大きさを適宜設定することができる。n $\geq$ 5であることが望ましい。

## 【0018】

本発明の高分子化合物は、次のいずれかの方法によって得ることができる。

(1) アミノアルキルアクリルアミド、アミノアルキルメタクリルアミド、アミノアルキルアクリルアミド塩酸塩およびアミノアルキルメタクリルアミド塩酸塩のうちのいずれかの化合物と無水酢酸、無水プロピオン酸などのような酸無水物もしくはプロピルラクトン、ブチルラクトンなどのようなラクトンと反応させて得られる生成物をカラム等で精製し、得られた精製物をメタノール、エタノール、ジメチルスルホキシドなどの溶媒中で重合する。この場合、上記式で表され

る高分子化合物のRはアミノ基を有するモノマーのアルキル基の大きさにより、R'は酸無水物もしくはラクトンによって変えることができる。

(2) アルキルジアミン(例えば、エチレンジアミン、トリメチレンジアミン、テトラメチレンジアミン、ペンタメチレンジアミン、ヘキサメチレンジアミン等)と、無水酢酸、無水プロピオン酸などのような酸無水物もしくは塩化アセチルや塩化プロピオニルのようなアルキル酸クロライドもしくは二炭酸ジ- $\epsilon$ -ブチルとの反応により得られた生成物または1つのアミノ基とアミド結合を分子内に有する化合物とアクリロイルクロライドもしくはメタクリロイルクロライドとの反応物をカラム等で精製し、得られた精製物をメタノール、エタノール、ジメチルスルホキシドなどの溶媒中で重合する。この場合、上記式で表される高分子化合物のRはアルキルジアミンのアルキレンの大きさにより、R'は酸無水物もしくはアルキル酸クロライドによって変えることができる。

#### 【0019】

酸無水物とは無水カルボン酸を意味し、例えば、無水酢酸、無水プロピオン酸、無水酪酸、無水イソ酪酸、無水吉草酸、無水イソ吉草酸、無水カプロン酸、無水マレイン酸等を例示できる。

#### 【0020】

ラクトン類としては $\beta$ -プロピオラクトン、 $\gamma$ -ブチルラクトン、 $\gamma$ -バレロラクトン、 $\delta$ -バレロラクトン、 $\gamma$ -ヘキサノラクトン、 $\delta$ -ヘキサノラクトン、 $\epsilon$ -カプロラクトンや光学活性基を含む $\alpha$ -アミノ- $\gamma$ -ブチロラクトンなどを挙げる事ができる。

#### 【0021】

アミノアルキルアクリルアミド、アミノアルキルメタクリルアミド、アミノアルキルアクリルアミド塩酸塩およびアミノアルキルメタクリルアミド塩酸塩のうちのいずれかの化合物と酸無水物との反応はアルコール等の溶媒中でトリエチルアミン(TEA)のような塩基性の化合物を入れ、どちらか一方をゆっくり滴下しながら反応を行う。このとき反応温度は氷冷中で行い、メタノール溶媒を使用するのが望ましい。

#### 【0022】

反応後は溶媒をエバポレーターで除去し、析出物をろ過し、カラムクロマトグラフィーにより目的物を分離した。目的物は再結晶により精製した。

#### 【0023】

精製モノマーは重合開始剤を含む、水溶液もしくは有機溶媒中で行い、重合反応後はアルコール溶媒、アセトン溶媒、エーテル溶媒中かもしくはこれらの混合溶媒中で再沈殿を行い目的のポリマーを得た。

#### 【0024】

本発明は1, 3-プロピルジアミン、エチレンジアミン、1, 6-ヘキサメチレンジアミン、1, 2-プロパンジアミンなどのアルキルジアミンもしくはスペルミンやスペルミジンなどのジアミン類とこれと当モル量の酸無水物もしくはアルキル酸クロライドの反応物とアクリロイルクロライドもしくはメタクリロイルクロライドの反応物を精製し、これをモノマーとして重合反応を行うことで同様な化合物を得ることができる。

#### 【0025】

得られた高分子は高分子側鎖の炭素数の大きさ、分子量、塩濃度により曇点を自由に制御できる。例えば、水溶液の塩濃度が高くなると曇点は下がる傾向を示す。

#### 【( ( 2 ( )

また、他のアルキルアクリルアミドまたはアルキルメタクリルアミド、例えば、N-イソプロピルアクリルアミド、N-イソプロピルメタクリルアミド、N-プロピルアクリルアミド、N-プロピルメタクリルアミド、あるいはアルキルアクリレートまたはアルキルメタクリレート、例えば、ブチルアクリレート、ブチルメタクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシエチルメタクリレート、グリシジルアクリレート、グリシジルメタクリレート、などとの共重合により色々な曇点を有する高分子材料を合成できる。n-ブチルアクリルアミドとの共重合体では曇点は下がり、アクリルアミドとの共重合体では曇点は上昇する。

#### 【0027】

また、アクリル酸もしくはメタクリル酸のようなアニオン性基を有するような

モノマーあるいはアクリロキシエチルトリエチルアンモニウムもしくはメタクリロキシエチルトリエチルアンモニウムのようなカチオン性基を有するようなモノマーとの共重合により pH に環境の変化によっても曇点が制御できる高分子を合成できる。

## 【0028】

この熱応答性高分子の曇点を起こす現象としては側鎖の水和水もしくは高分子側鎖の分子内、分子間で形成される相互作用の崩壊、形成によるものと考えられる。

## 【0029】

## 【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれによって何ら限定されるものではない。

## 【0030】

【実施例 1】プロピオンアミド-プロピルメタクリルアミド ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CONH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ ) の合成

3-アミノプロピルメタクリルアミド塩酸塩をメタノール溶媒中に 0.8 g 溶解させ、プロピオン酸無水物 1.0 g とトリエチルアミン (TEA) 0.9 g をこれに加え氷冷中で 4 時間攪拌を行った。反応後、エバポレーターで溶媒を除去し、析出物をろ過し、濾液を分取した。この濾液をシリカカラムに入れ目的物を溶離液を含む部分を分取し再結晶により目的物をプロピオンアミド-プロピルメタクリルアミド精製した (収率 95%)。精製物の質量分析の結果 (図 1) と  $^1\text{H-NMR}$  の結果 (図 2) を示した。

## 【0031】

【実施例 2】アセチルアミド-プロピルメタクリルアミド ( $\text{CH}_3\text{CONH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ ) の合成

3-アミノプロピルメタクリルアミド塩酸塩をメタノール溶媒中に 0.8 g 溶解させ、酢酸無水物 0.9 g とトリエチルアミン (TEA) 0.9 g をこれに加え氷冷中で 4 時間攪拌を行った。反応後、エバポレーターで溶媒を除去し、析出物をろ過し、濾液を分取した。この濾液をシリカカラムに入れ目的物を溶離液を

含む部分を分取し再結晶により目的物をアセチルアミド、N-3-プロピルメタクリルアミド精製した（収率92％）。

【0032】

【実施例3】ブチルアミド-プロピルメタクリルアミド ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CONH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ ) の合成

3-アミノプロピルメタクリルアミド塩酸塩をメタノール溶媒中に0.8g溶解させ、酪酸無水物1.5gとトリエチルアミン(TEA)0.9gをこれに加え氷冷中で4時間撹拌を行った。反応後、エバポレーターで溶媒を除去し、析出物をろ過し、濾液を分取した。この源液をシリカカラムに入れ目的物を溶離液を含む部分を分取し再結晶により目的物をブチルアミド、N-3-プロピルメタクリルアミド精製した（収率92％）。

【0033】

【実施例4】プロピオンアミド-プロピルアクリルアミド ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CONH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ) の合成

1,3-アミノプロピルジアミン5.0gをアセトニトリル溶媒150ml中に氷冷条件下で混合させて、これにアクリル酸クロライド6.0gをアセトニトリル60mlに溶解させた溶液を氷冷中でゆっくりと滴下を行いながら、5時間撹拌を行った。撹拌後、析出物を分取し、メタノール溶媒に溶解させ、シリカカラムで3-アミノプロピルアクリルアミドの精製を行った。この物質を含む溶離液に無水プロピオン酸10g加え氷冷中で撹拌を行った。反応後、エバポレーターで溶媒を除去し、析出物をろ過し、濾液を分取した。この濾液をシリカカラムに入れ目的物を溶離液を含む部分を分取し再結晶により目的物をプロピオンアミド-プロピルメタアクリルアミド精製した（収率75％）。

【0034】

【実施例5】ブチルアミド-プロピルメタクリルアミドの重合

ブチルアミド、N-3-プロピルメタクリルアミドのモノマーを0.3gをn-プロパノール5mlに溶解させ2,2-アゾビスイソブチルニトリル(AIBN)6.2mgを加え75℃で12時間、窒素雰囲気下で重合を行った。重合反応後、氷冷しその後にエバポレーターで溶媒を半分除去し、アセトン溶媒中で再

沈殿を行い、真空条件下で乾燥を行った。乾燥後 1 wt % のポリブチルアミドと N-3-プロピルメタクリルアミド水溶液とを調製し温度変化によりこれら溶液の透過率を測定した。この結果から水溶液中中で曇点を示すことが確認された。その結果を図 3 に示す。

#### 【0035】

##### 【実施例 6】 アセチルアミド-プロピルメタクリルアミドの重合

アセチルアミド、N-3-プロピルメタクリルアミドのモノマーを 0.4 g をメタノール 5 ml に溶解させ 2, 2-アゾビス (2-アミジノプロパン) 二塩酸塩 6.0 mg を加え 65℃ で 4 時間、窒素雰囲気下で重合を行った。重合反応後、氷冷しその後にエバポレーターで溶媒を半分除去し、アセトン溶媒中で再沈殿を行い、真空条件下で乾燥を行った。乾燥後 1 wt % のポリアセチルアミド、N-3-プロピルメタクリルアミド水溶液と 1.0, 0.5 および 0.25 M 濃度の NaCl 溶液を調製し温度変化によりこれら溶液の透過率を測定した。この結果から NaCl 溶液中で曇点を示し塩濃度の増加により曇点が下がるのが確認された。その結果を図 4 に示す。

#### 【0036】

##### 【実施例 7】 プロピオンアミド-プロピルメタクリルアミドの重合

プロピオンアミド-プロピルメタクリルアミドを 0.7 g をメタノール 8 ml に溶解させ 2, 2-アゾビス (2-アミジノプロパン) 二塩酸塩 6.2 mg を加え 65℃ で 4 時間、窒素雰囲気下で重合を行った。重合反応後、氷冷しその後にエバポレーターで溶媒を半分除去し、アセトン溶媒中で再沈殿を行い、真空条件下で乾燥を行った。乾燥後 1 wt % のポリアセチルアミド-プロピルメタクリルアミド 500 mM NaCl 水溶液を調製し 70℃ の恒温槽に入れたところ白く白濁した。次に、白濁したこの溶液を氷冷中に入れることで、溶解した。この現象がリバーシブルに起こることからこのポリマーには曇点があることが確認された。さらに、乾燥後 1 wt % のポリアセチルアミド-プロピルメタクリルアミド水溶液と 0.5 および 0.25 M 濃度の NaCl 溶液を調製し温度変化によりこれら溶液の透過率を測定した。この結果から NaCl 溶液中で曇点を示し塩濃度の増加により曇点が下がるのが確認された。その結果を図 5 に示す。

【 0 0 3 7 】

【発明の効果】

本発明における分離材料による分離方法は、下記の利点を有する。

- 1) 従来のアミド系に代表されるような熱応答性高分子よりも大きな側鎖を持つ熱応答性高分子を得ることができる。
- 2) 側鎖にある2カ所のアルキル基の組み合わせによる炭素数の設計により、曇点および高分子の極性の制御を自由に行うことができる。
- 3) これにより、様々な極性を有するタンパク質等のようなバイオプロダクトを分離、精製することが可能になった。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

実施例 1 の精製物の質量分析の結果を示すスペクトル図である。

【図 2】

実施例 1 の精製物の<sup>1</sup>H-NMRの結果を示すスペクトル図である。

【図 3】

実施例 5 で得られた重合体の温度と透過率の関係を表すグラフである。

【図 4】

実施例 6 で得られた重合体の温度と透過率の関係を表すグラフである。

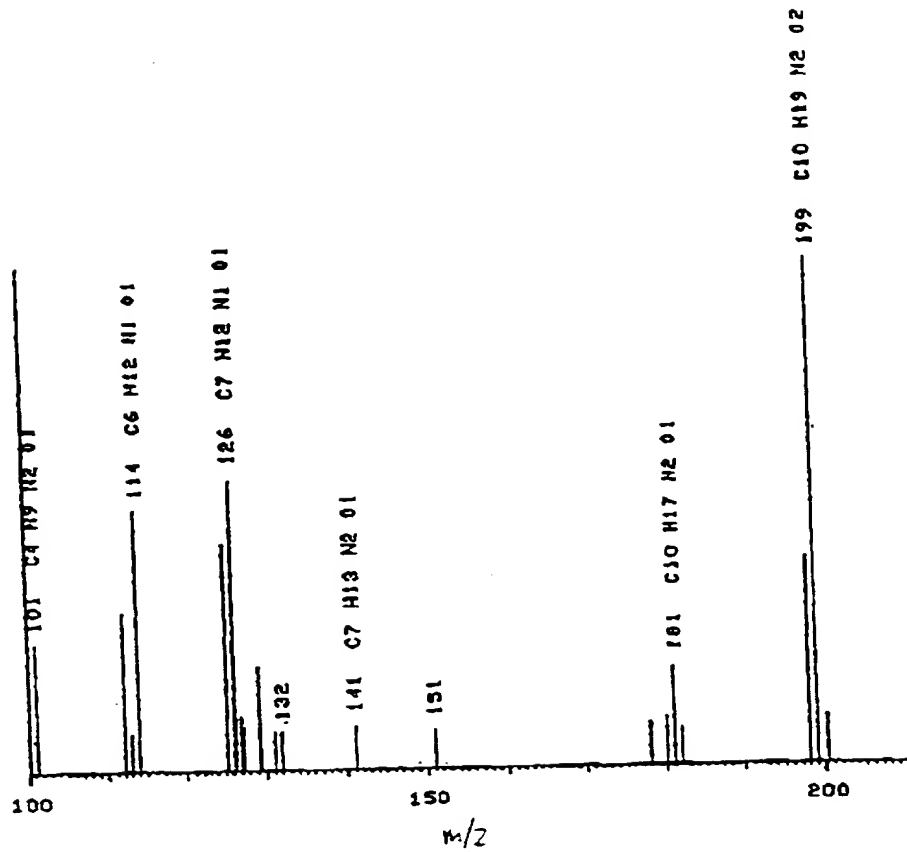
【図 5】

実施例 7 で得られた重合体の温度と透過率の関係を表すグラフである。

【書類名】

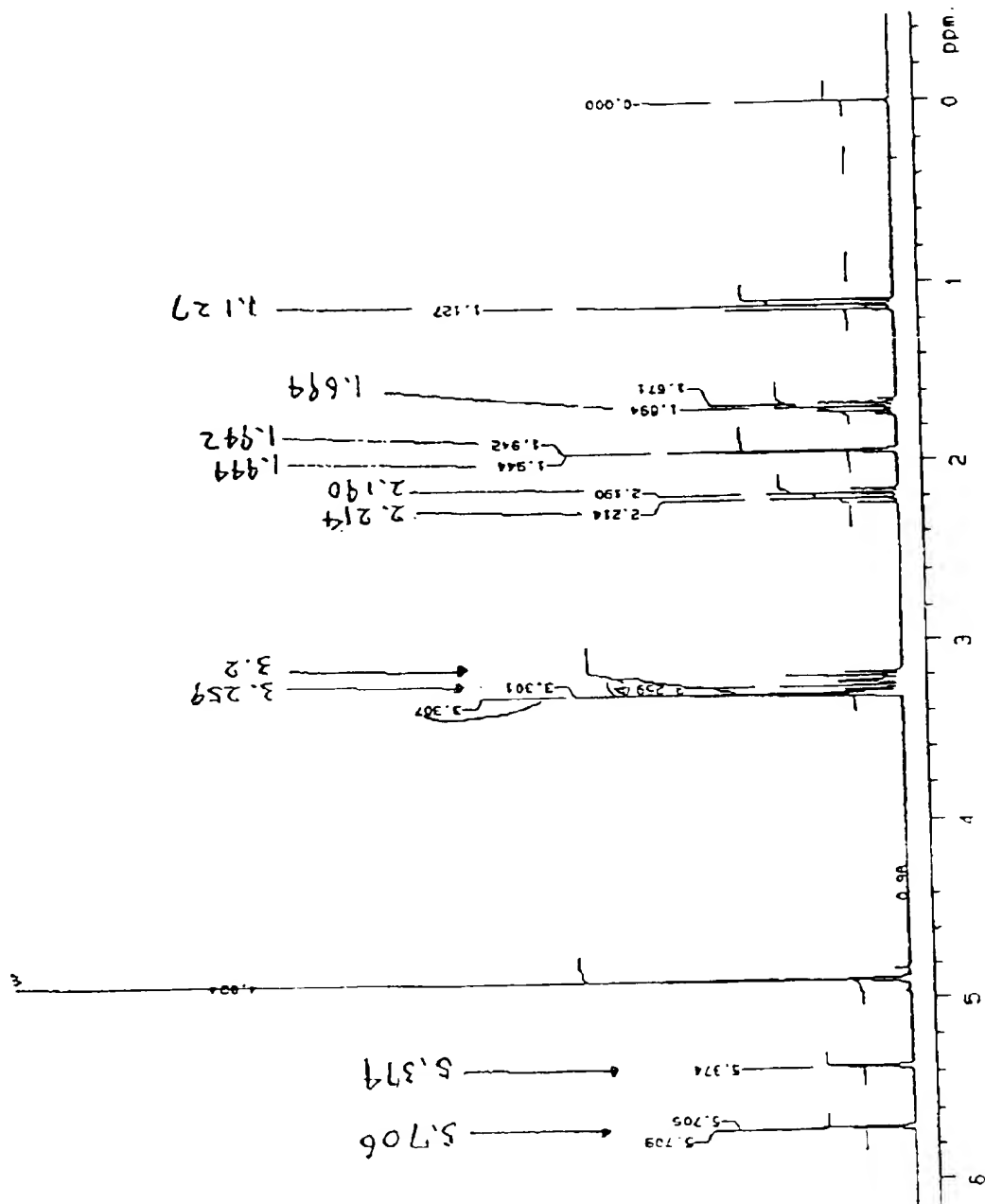
図面

【図 1】

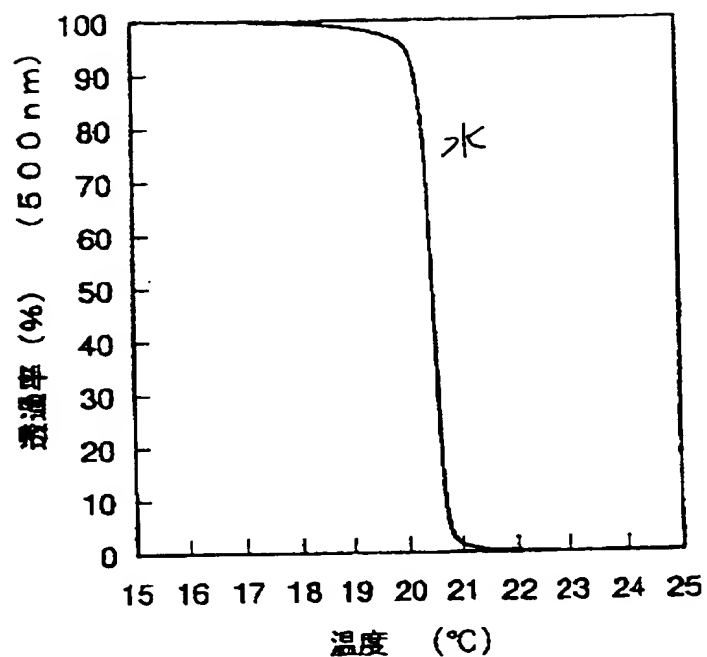




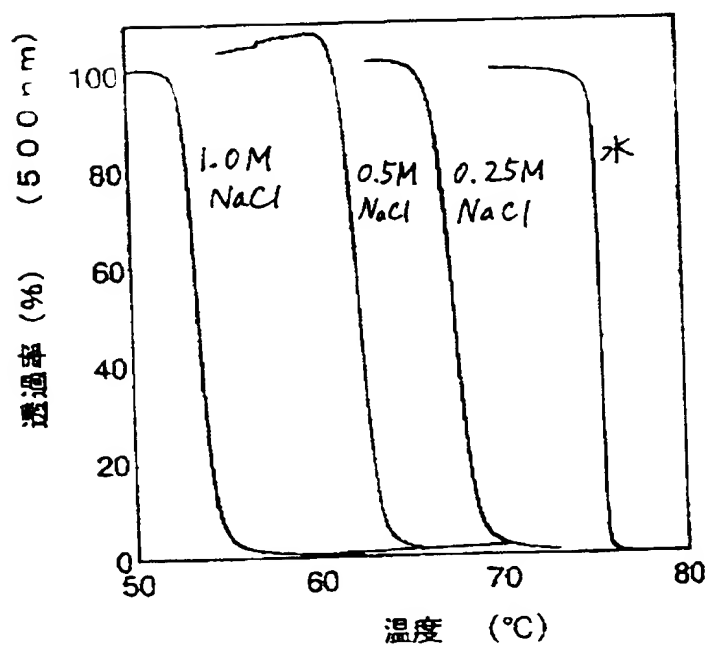
【図 2】



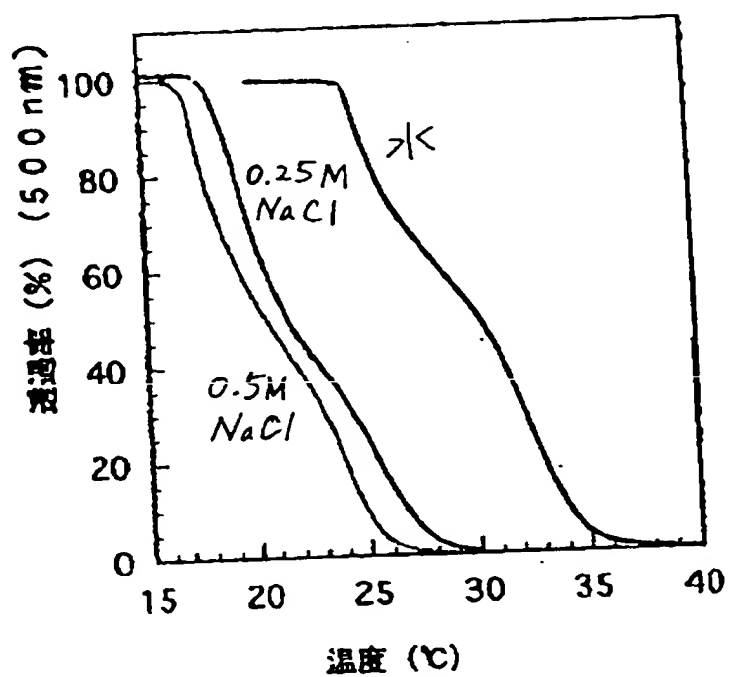
【図 3】



【図 4】



【図 5】



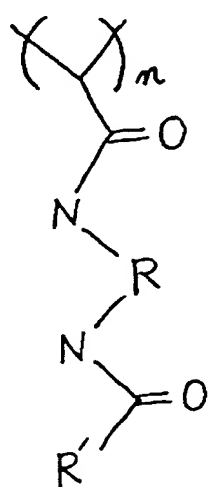
【書類名】 要約書

【要約】

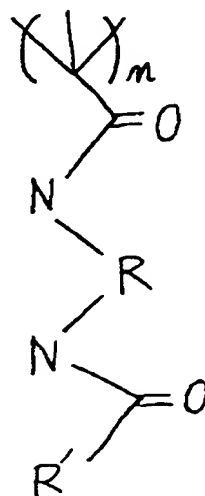
【課題】 炭素数の大きな側鎖を有する熱応答性高分子材料およびその製造法を提供すること。

【解決手段】 下式

【化1】



または



(式中、Rは炭素数1～8の直鎖または分岐の2価の脂肪族炭化水素基、炭素数3～8の2価の脂環式炭化水素基または炭素数6～14の2価の芳香族炭化水素基を示し、R'は炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の水酸基を有する炭素数1～8の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有する炭素数2～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基、または1個または2個以上の酸アミド結合および／またはエステル結合を有し、かつ1個または2個以上の水酸基を含む炭素数3～9の直鎖または分岐の脂肪族炭化水素基を示し、nは2以上の整数を表す)で表され、その側鎖にアミド結合を二カ所導入した高分子化合物を用いる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597145779]

1. 変更年月日 1998年 4月10日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都新宿区百人町3丁目25番1号 サンケンビルヂング  
氏 名 アマシャム ファルマシア バイオテック株式会社

